



Получено: 8.08.2023 г. | Принято: 18.08.2023 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.5.248.255>

Научная статья

## АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОПЛАТФОРМ ДЛЯ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТЕНИЯ

А.И.Ахметова<sup>1,2</sup>, к.ф.-м.н., мл. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-5115-8030 / [akhmetovaa@my.msu.ru](mailto:akhmetovaa@my.msu.ru)  
И.В.Яминский<sup>1,2</sup>, д.ф.-м.н., проф. МГУ имени М.В.Ломоносова, ORCID: 0000-0001-8731-3947  
И.Ю.Ильина<sup>1</sup>, инж., ORCID: 0000-0003-0967-6296  
Ю.Д.Александров<sup>1,3</sup>, инж., ORCID: 0009-0000-4017-7124  
В.Е.Тихомирова<sup>1,3</sup>, к.х.н., науч. сотр., ORCID: 0000-0003-4368-3430  
Е.В.Попова<sup>1,3</sup>, к.х.н., вед. инж., ORCID: 0000-0002-2419-2823

**Аннотация.** В данной работе исследуются варианты наноплатформ для доставки биологически активных соединений, включая двуцепочечную РНК (дцРНК), в растительную клетку на основе кальций-фосфатных (СаР), хитозановых, золотых наночастиц, а также наноэмульсий на основе неионогенных ПАВ. С помощью атомно-силовой микроскопии оценивались морфологические характеристики носителей, характер расположения на подложках графита и слюды, геометрические размеры для дальнейшей оценки их возможности формировать комплексы с дцРНК. Проект нацелен на поиск наноплатформ различной химической природы для создания композитов с биологически активными РНК, которые обеспечивают сохранность молекул при экзогенном применении (опрыскивании растений) и увеличивают эффективность их доставки в листья растений для защиты растений от патогенов (вирусов).

**Ключевые слова:** наноплатформы, золотые наночастицы, кальций-фосфатные частицы, наноэмульсии, сканирующая зондовая микроскопия, бионаноскопия

**Для цитирования:** А.И. Ахметова, И.В. Яминский, И.Ю. Ильина, Ю.Д. Александров, В.Е. Тихомирова, Е.В. Попова. АСМ-исследование наноплатформ для доставки биологически активных соединений в растения. НАНОИНДУСТРИЯ. 2023. Т. 16, № 5. С. 248–255. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.5.248.255>

Received: 8.08.2023 | Accepted: 18.08.2023 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.5.248.255>

Original paper

## AFM STUDY OF NANOPLATFOMS FOR THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS DELIVERY TO PLANTS

A.I.Akhmetova<sup>1,2</sup>, Cand. of Sci. (Physics and Mathematics), Junior Researcher, ORCID: 0000-0002-5115-8030 / [akhmetovaa@my.msu.ru](mailto:akhmetovaa@my.msu.ru)  
I.V.Yaminsky<sup>2</sup>, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Prof., ORCID: 0000-0001-8731-3947  
I.Yu.Ilyina<sup>1</sup>, Engineer, ORCID: 0000-0003-0967-6296  
Yu.D.Aleksandrov<sup>1,3</sup>, Engineer, ORCID: 0009-0000-4017-7124  
V.E.Tikhomirova<sup>1,3</sup>, Researcher, ORCID: 0000-0003-4368-3430  
E.V.Popova<sup>1,3</sup>, Leading Engineer, ORCID: 0000-0002-2419-2823

<sup>1</sup> Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Россия / Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Physical department, Moscow, Russia

<sup>3</sup> МГУ имени М.В.Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия / Lomonosov Moscow State University, Chemical department, Moscow, Russia



**Abstract.** In this work, nanoplatforms based on calcium phosphate (CaP), chitosan, and gold nanoparticles, as well as nanoemulsions based on nonionic surfactants, are studied for the delivery of biologically active compounds, including double-stranded RNA (dsRNA), into a plant cell. Using atomic force microscopy, the morphological characteristics of the carriers, the nature of the arrangement on graphite and mica substrates, and the geometric dimensions were evaluated to further assess their ability to form complexes with dsRNA. The project is aimed at searching for nanoplatforms of various chemical nature to create composites with biologically active RNA, which ensure the safety of molecules during exogenous application (plant spraying) and increase the efficiency of their delivery to plant leaves to protect plants from pathogens (viruses).

**Keywords:** nanoplatforms, gold nanoparticles, calcium phosphate particles, nanoemulsions, scanning probe microscopy, bionanoscropy

**For citation:** A.I. Akhmetova, I.V. Yaminsky, I.Yu. Ilyina, Yu.D. Aleksandrov, V.E. Tikhomirova, E.V. Popova. AFM study of nanoplatforms for the biologically active compounds delivery to plants. NANOINDUSTRY. 2023. V. 16, no. 5. PP. 248–255. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.5.248.255>.

## ВВЕДЕНИЕ

В связи с изменениями климата вспышки болезней сельскохозяйственных растений и экологические стрессы, вероятно, будут оказывать возрастающее негативное воздействие на производство продуктов питания. Эта проблема требует разработки новых инновационных методов защиты растений от патогенов, основанных на достижениях молекулярной, клеточной биологии и биотехнологии. Такими методами являются РНК-технологии, основанные на механизме РНК-интерференции (РНКи), который является основным механизмом защиты растений от вирусных инфекций. При вирусных инфекциях этот механизм индуцируется дцРНК (репликативной формой вирусной РНК) и приводит к деградации комплементарной вирусной РНК [1].

Наиболее перспективным и безопасным (экологически чистым) представляется подход, при котором антивирусная защита на основе РНКи индуцируется опрыскиванием растений экзогенной дцРНК (или шпилечной РНК), комплементарной вирусной РНК, названный "спрей-индуцированный сайленсинг генов" (spray-induced gene silencing (SIGS)) [2]. Опрыскивание растений дцРНК успешно применяется для индукции устойчивости к вирусам на различных сельскохозяйственных культурах. Одной из проблем при применении молекул дцРНК является их нестабильность в окружающей среде, что приводит к короткому временному промежутку их антивирусной активности. Другая основная проблема заключается в обеспечении эффективной доставки молекул РНК в клетки растения. Специфическая структура поверхности листа и собственно растительной клетки делают проблему доставки биологически активных молекул в растение особенно сложной. Для решения этих задач используются разнообразные наноплатформы [3]. Однако разработка

## INTRODUCTION

Due to climate change, outbreaks of agricultural plant diseases and environmental stresses are likely to have an increasing negative impact on food production. This problem requires new innovative methods development of plant protection against pathogens based on the achievements of molecular, cell biology and biotechnology. Such methods are RNAi technologies based on the mechanism of RNA interference (RNAi), which is the main mechanism of plant defense against viral infections. In viral infections, this mechanism is induced by dsRNA (replicative form of viral RNA) and leads to degradation of complementary viral RNA [1].

The most promising and safe (environmentally friendly) approach seems to be the one where RNAi-based antiviral defense is induced by spraying plants with exogenous dsRNA (or hairpin RNA) complementary to viral RNA, called spray-induced gene silencing (SIGS). [2] Spraying plants with dsRNA has been successfully used for induction of virus resistance in various crops. One of the problems in dsRNA molecules application is their instability in the environment, resulting in short time window of their antiviral activity. Another major challenge is to ensure efficient delivery of the RNA molecules into plant cells. The specific structure of the leaf surface and the plant cell itself make the problem of delivery of biologically active molecules into the plant particularly challenging. A variety of nanoplatforms are used to solve these problems [3]. However, biocompatible, biodegradable nanoplatforms development that provide protection of regulatory RNAs and their effective penetration into plant cells is still an urgent task, and without their solution the wide RNAi technologies application in practice of crop production is impossible.

биосовместимых, биodeградируемых наноплатформ, обеспечивающих защиту регуляторных РНК и их эффективное проникновение в клетки растений, по-прежнему является актуальной задачей, без решения которой широкое применение РНК технологий в практике растениеводства невозможно.

Размер наноплатформ является существенным фактором, ограничивающим проникновение средств доставки в растения [4]. Йонг и др. (2021) пришли к выводу, что размер в 50 нм является базовой величиной для наноматериалов, которые могут свободно проникать в клетки пыльцы томатов [5]. Другие исследования показали, что размер наночастиц, которые могут свободно проникать в растительные клетки, должен быть менее 20 нм, по крайней мере, в одном измерении. На проникновение композитов в растительные клетки влияют и такие характеристики наноматериалов, как например, форма и дзета-потенциал. Поэтому для выбора платформы, выступающей в качестве носителя для стабилизации, защиты и доставки молекул дцРНК в клетки растений, требуется тщательное исследование их морфологических, геометрических, адсорбционных и других физических характеристик.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**CaP-частицы:** CaP-частицы размером  $80 \pm 20$  нм и CaP-частицы, покрытые хитозаном 5 кДа размером  $160 \pm 25$  нм, были синтезированы по методике [6]. Образец суспензии частиц объемом 1 мкл наносили на графит, выдерживали 5 мин, промокали бумагой. Хитозановые частицы из 5 кДа хитозана размером  $110 \pm 20$  нм, хитозановые частицы из 72 кДа гликоль-хитозана размером  $250 \pm 10$  нм были получены методом ионотропного гелеобразования [7]. Данные о размерах получены методом динамического светорассеяния.

**Золотые наночастицы:** в работе рассматривались золотые наночастицы в полиэтиленимине, концентрация – 0,2 ммол, 0,5 мкл наносили на слюду и на графит.

**Наноэмульсии на основе неионогенных ПАВ:** нiosомы с хлоргексидином, эмульсии с частицами глины с модифицированной поверхностью, 0,5 мкл наносили на слюду и на графит.

Основной метод настоящего исследования – атомно-силовая микроскопия. Сканирование проводилось на воздухе в контактном режиме кантилевером CSG10 на подложках свежесколотых графита (высокоориентированный пиролитический графит) и слюды с помощью атомно-силового микроскопа "ФемтоСкан". Обработка результатов проводилась в программном обеспечении "ФемтоСкан Онлайн", которое позволяет создавать трехмерные изображения, строить контурную длину, проводить

The nanoplatform sizes is a significant factor limiting penetration of vehicles delivery into plants. Yong *et al.* (2021) [4] concluded that a size of 50 nm is the reference size for nanomaterials that can freely penetrate tomato pollen cells [5]. Other studies have shown that the nanoparticles size that can freely penetrate plant cells should be less than 20 nm in at least one dimension. The penetration of composites into plant cells is also influenced by nanomaterial characteristics such as, for example, shape and zeta potential. Therefore, a careful study of their morphological, geometric, adsorption and other physical characteristics is required to select a platform to act as a carrier for stabilization, protection and delivery of dsRNA molecules into plant cells.

#### MATERIALS AND METHODS

**CaP-particles:** CaP-particles of  $80 \pm 20$  nm and CaP-particles coated with 5kDa chitosan of  $160 \pm 25$  nm were synthesized according to the method [6]. The 1  $\mu$ l sample of particle suspension was applied to graphite, incubated for 5 min, and blotted with paper. Chitosan particles of 5 kDa chitosan size  $110 \pm 20$  nm, chitosan particles of 72 kDa glycol-chitosan and size  $250 \pm 10$  nm were obtained by ionotropic gelation method [7]. The size data were obtained by dynamic light scattering method.

**Gold nanoparticles:** the work considered gold nanoparticles in polyethylenimine, concentration – 0.2 mmol, 0.5  $\mu$ l were applied on mica and on graphite.

**Nanoemulsions based on non-ionogenic surfactants:** niosomes with chlorhexidine, emulsions with clay particles with modified surface, 0.5  $\mu$ l applied on mica and on graphite.

The main method of the present study is atomic force microscopy. Scanning was performed in air in contact mode with a CSG10 cantilever on freshly pierced graphite (highly oriented pyrolytic graphite) and mica substrates using a FemtoScan atomic force microscope. The results were processed in FemtoScan Online software, which allows obtaining three-dimensional images, constructing contour lengths, filtering, image processing, and performing the necessary quantitative calculations: area, volume, perimeter, greatest height, and roughness of the object [8, 9].

#### RESULTS

The morphological characteristics of the carriers, and nature of their arrangement on graphite and mica substrates, and their geometric dimensions were evaluated in order to further assess their ability to form complexes with dsRNA (Fig.1).

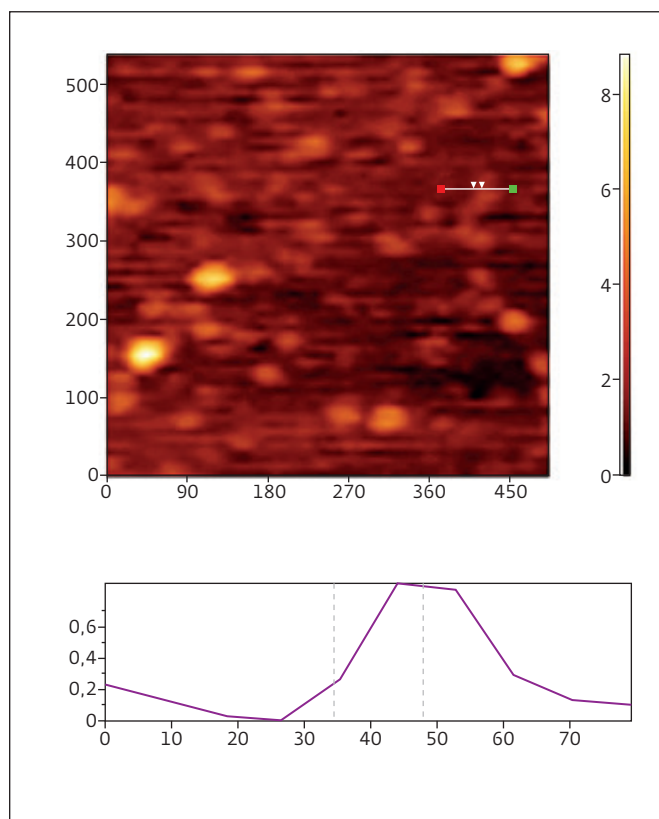


Рис.1. 2D-вид и сечение по высоте дцРНК. На изображении видны отдельные нити и агрегаты РНК. Высота одиночных нитей РНК около 0,6 нм

Fig.1. 2D view and height cross-section of dsRNA. The image shows single strands and aggregates of RNA. The height of single RNA strands is about 0.6 nm

фильтрацию, обработку изображений и выполнять необходимые количественные вычисления: площадь, объем, периметр, наибольшую высоту, шероховатость объекта [8, 9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе оценивались морфологические характеристики носителей, характер расположения на подложках графита и слюды, геометрические размеры для дальнейшей оценки возможности формировать комплексы с дцРНК (рис.1).

Для каждого образца был сформирован характерный профиль поверхности, чтобы в дальнейшем при создании комплекса для доставки дцРНК можно было идентифицировать носитель по характерным паттернам морфологии поверхности.

## CaP-ЧАСТИЦЫ, ГИБРИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ФОСФАТА КАЛЬЦИЯ И ХИТОЗАНА

Поскольку фосфат кальция входит в состав человеческого организма, он является перспективным

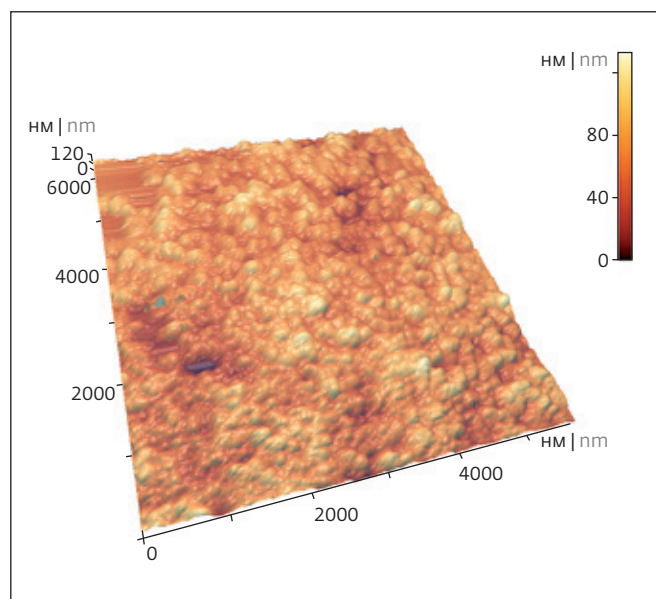


Рис.2. 3D-вид. CaP-частицы. Частицы плотно распределены на поверхности графита, характерный диапазон высот на поле в 7 мкм до 130 нм. АСМ, контактный режим  
Fig.2. 3D view. CaP particles. The particles are densely distributed on the graphite surface, with a characteristic height range on the field of 7  $\mu\text{m}$  to 130 nm. AFM, contact mode

A characteristic surface profile was formed for each sample so that in future, when creating a complex for dsRNA delivery, it would be possible to identify the carrier by characteristic patterns of surface morphology.

## CaP-PARTICLES, HYBRID PARTICLES BASED ON CALCIUM PHOSPHATE AND CHITOSANE

Since calcium phosphate is part of a human body, it is a promising material for use in medicine. Due to its biocompatibility, biodegradability, and controlled properties, calcium phosphate can be used in the form of nano- and microparticles as a carrier of drugs [10].

CaP-particles are the good candidates as carriers because they have a high affinity for nucleic acids [11], and due to controlled synthesis it is possible to obtain particles of suitable size for gene delivery inside cells. The particles considered in this work were: CaP particles (Fig.2), as well as hybrid particles, which are CaP particles coated with 5kDa chitosan (Fig.3). We hypothesize that such hybrid particles can combine the promising properties for two materials.

## CHITOSAN PARTICLES

Chitosan-based carriers are extremely promising because of its proven biocompatibility, biodegradability, nontoxicity, and adsorption ability. Nanoparticles made of chitosan and its derivatives can be used for

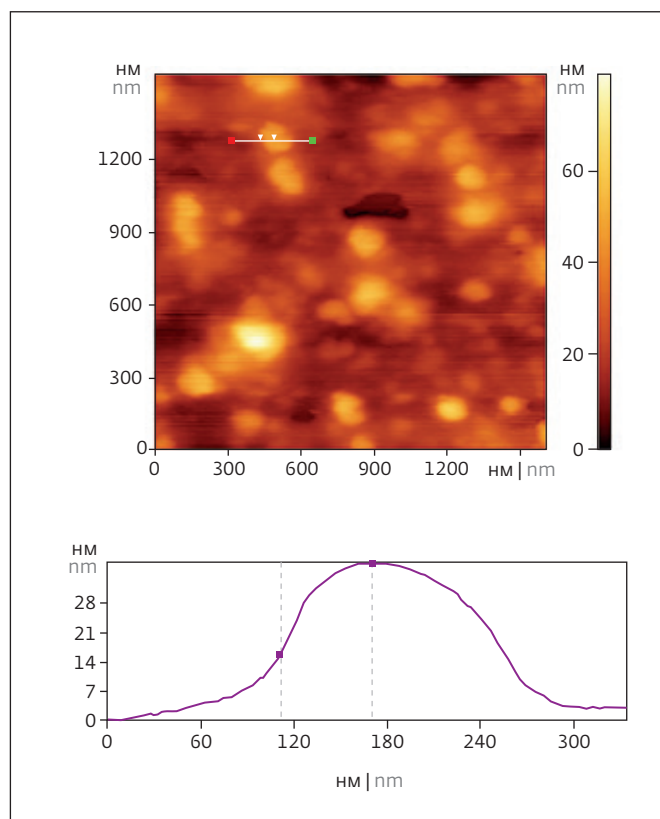


Рис.3. 2D-вид и сечение CaP-частицы, покрытых хитозаном 5 кДа. По данным сечения высота частицы 21 нм, радиус 59 нм

Fig.3. 2D view and cross section of CaP particles coated with 5 kDa chitosan. According to the cross-sectional data, the particle height is 21 nm, radius is 59 nm

материалом для использования в медицине. Благодаря биосовместимости, биodeградируемости, контролируемым свойствам фосфат кальция может применяться в виде нано- и микрочастиц в качестве носителя лекарственных средств [10].

CaP-частицы являются хорошим кандидатом на роль носителя, поскольку обладают высоким средством к нуклеиновым кислотам [11], а благодаря контролируемому синтезу возможно получить частицы подходящего размера для доставки генов внутрь клеток. В работе рассматривались: CaP-частицы (рис.2), а также гибридные частицы, представляющие собой CaP-частицы, покрытые 5 кДа хитозаном (рис.3). Мы предполагаем, что такие гибридные частицы могут объединить перспективные свойства двух материалов.

### ХИТОЗАНОВЫЕ ЧАСТИЦЫ

Носители на основе хитозана являются крайне перспективными из-за его доказанной биосовместимости, биоразлагаемости, нетоксичности

nucleic acids delivery [12, 13], the positive surface charge of such particles can provide efficient loading and protection of incorporated drugs from nuclease activity [14]. However, despite the great progress in the use of chitosan in the field of medicine and pharmaceuticals, the chitosan-based delivery systems application in agriculture is still limited [15].

In our study, we examined particles derived from chitosan lactate with an average molecular weight of 5 kDa (Fig.4) and particles from a 72 kDa glycol-chitosan derivative (Fig.5).

### GOLDEN NANOPARTICLES

Gold nanoparticles have minimal cytotoxicity [16]. However, the use of this vector in plant cells has been reported relatively rarely. Zhang et al. used different sizes and shapes of gold nanoparticles to introduce DNA-Cy3 into plant cells by injection, spherical particles of 10 nm size, functionalized with small interfering RNAs, were the most effective in delivering miRNAs and induced gene silencing in mature leaves of *Nicotiana benthamiana* plants [17].

Both small particles around 100 nm and larger particles around 400 nm are present in the sample on mica, with a characteristic height range of 8 to 30 nm (Fig.6). Gold nanoparticles on graphite aggregated.

### NANOEMULSIONS BASED ON NON-IONOGENIC SAAS

Aqueous polyethylene glycol solution changes permeability of the cell membrane, which allows foreign genes to easily penetrate into the nucleus [18]. This method is relatively easy to apply on many plant species. According to the measurements results, all tested surfactant samples lay on the graphite surface as a film without characteristic particles, the sample with clay showed particles (Fig.7). The sample with chlorhexidine forms niosomes, but they are destroyed in the air.

### CONCLUSIONS

RNAi technologies being developed based on the achievements of molecular, cell biology and biotechnology are new innovative methods of plant protection against pathogens (in particular, viruses). The development of effective composites for exogenous treatment of crops is an urgent task. In this work, 3D images of carriers based on calcium-phosphate, chitosan, gold nanoparticles, as well as nanoemulsions based on non-ionic surfactants were obtained. Such parameters as adsorption on the hydrophobic surface of graphite, tendency to aggregation, their distribution on the surface, and the geometric dimensions of particles were evaluated.

Scanning probe microscopy can be used as a tool for three-dimensional visualization with nanometer

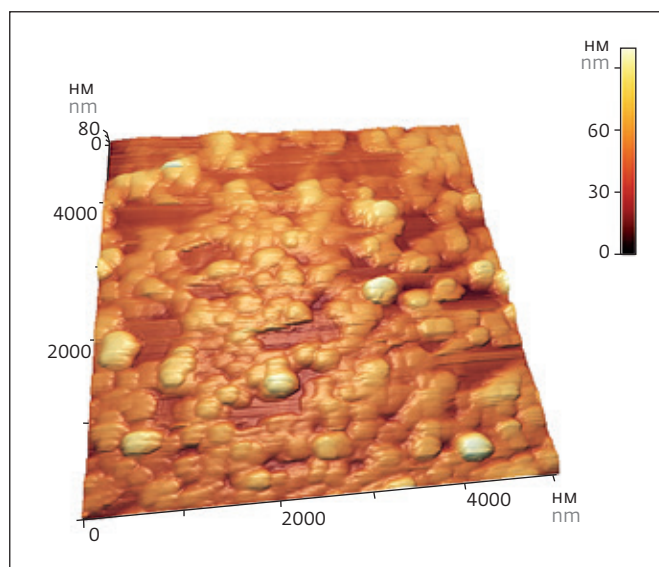


Рис.4. 3D-вид хитозановых частиц из 5 кДа хитозана  
Fig.4. 3D view of chitosan particles made of 5 kDa chitosan

и способности к адсорбции. Наночастицы из хитозана и его производных могут применяться для доставки нуклеиновых кислот [12, 13], положительный заряд поверхности таких частиц способен обеспечить эффективную загрузку и защиту включенных препаратов от нуклеазной активности [14]. Однако несмотря на большой прогресс в использовании хитозана в области медицины и фармацевтики, применение систем доставки на основе хитозана в сельском хозяйстве пока ограничено [15].

В нашем исследовании мы изучили частицы, полученные из лактата хитозана со средним молекулярным весом 5 кДа (рис.4) и частицы из производного 72 кДа гликоль-хитозана (рис.5).

### ЗОЛОТЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ

Золотые наночастицы обладают минимальной цитотоксичностью [16]. Однако об использовании этого вектора в растительных клетках сообщается относительно редко. Чжан и др. использовали различные размеры и формы золотых наночастиц для введения ДНК-СуЗ в растительные клетки путем инъекции, сферические частицы размером 10 нм, функционализованные малые интерферирующие РНК, оказались наиболее эффективными при доставке миРНК и вызывали сайленсинг генов в зрелых листьях растений *Nicotiana benthamiana* [17].

В образце на слюде присутствуют как маленькие частицы около 100 нм, так и более крупные – около 400 нм, характерный диапазон высот – от 8 до 30 нм (рис.6). Золотые наночастицы на графите агрегировали.

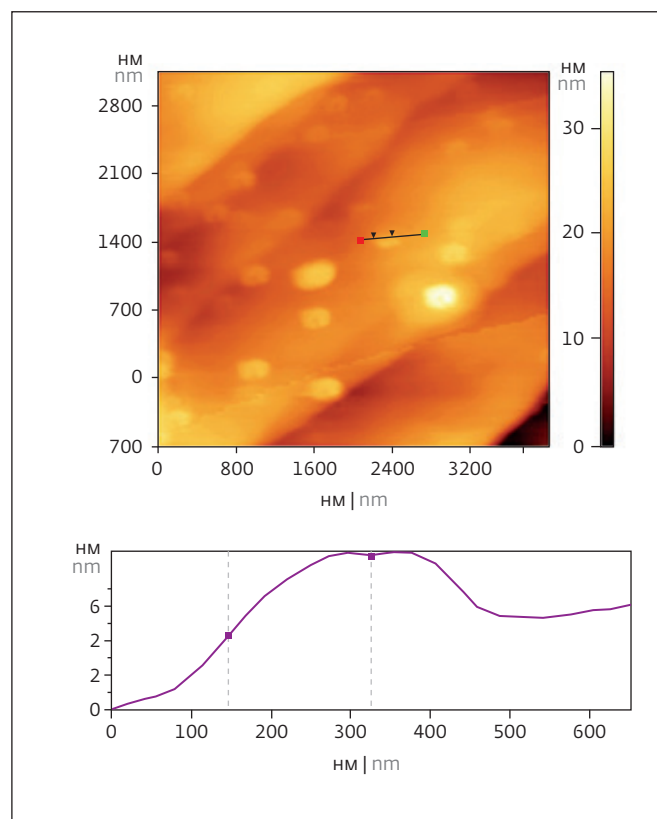


Рис.5. 2D-вид и сечение хитозановых частиц из 72 кДа гликоль-хитозана. По данным сечения высота около 5 нм, радиус 179 нм

Fig.5. 2D view and cross section of chitosan particles from 72 kDa glycol-chitosan. From the cross-sectional data, the height is about 5 nm and the radius is 179 nm

precision and for measuring local mechanical and physicochemical properties of nanoplatforms in the composites design with biologically active molecules (various regulatory RNAs and peptides).

### ACKNOWLEDGMENTS

The work of A.I.Akhmetova, I.Y.Ilyina, Y.D.Alexandrov, V.E.Tikhomirova, and E.V.Popova was supported by the Russian Science Foundation (Project No. 23-74-30003).

### PEER REVIEW INFO

Editorial board thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. It is also grateful for their consent to publish papers on the journal's website and SEL eLibrary eLIBRARY.RU.

**Declaration of Competing Interest.** The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

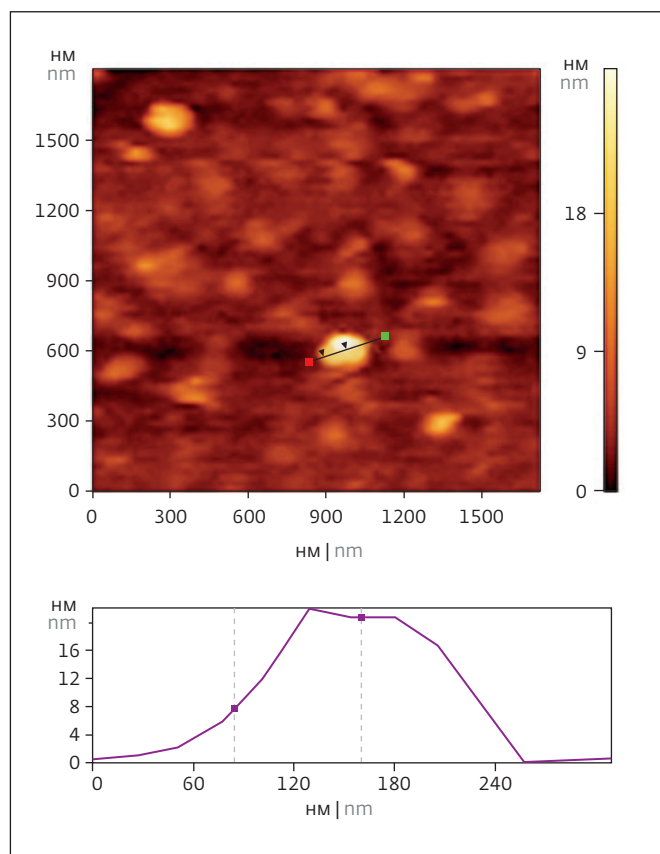


Рис.6. 2D-вид и сечение. Изображение частиц на поверхности слюды. Высота – 12 нм, радиус 75 нм  
Fig.6. 2D view and cross section. Image of particles on the surface of mica. Height – 12 nm, radius 75 nm

### НАНОЭМУЛЬСИИ НА ОСНОВЕ НЕИОНОГЕННЫХ ПАВ

Водный раствор полиэтиленгликоля изменяет проницаемость клеточной мембраны, что позволяет чужеродным генам легко проникать в ядро [18]. Этот метод относительно прост в применении на многих видах растений. По итогам измерений все исследуемые образцы ПАВ легли на поверхности графита пленкой без характерных частиц, на образце с глиной обнаружены частицы (рис.7). Образец с хлоргексидином образует ниосомы, но при высыхании на воздухе они разрушаются.

### ВЫВОДЫ

Разрабатываемые РНК-технологии, основанные на достижениях молекулярной, клеточной биологии и биотехнологии, являются новыми инновационными методами защиты растений от патогенов (в частности, вирусов). Разработка эффективных композитов для экзогенной обработки сельскохозяйственных культур является актуальной задачей.

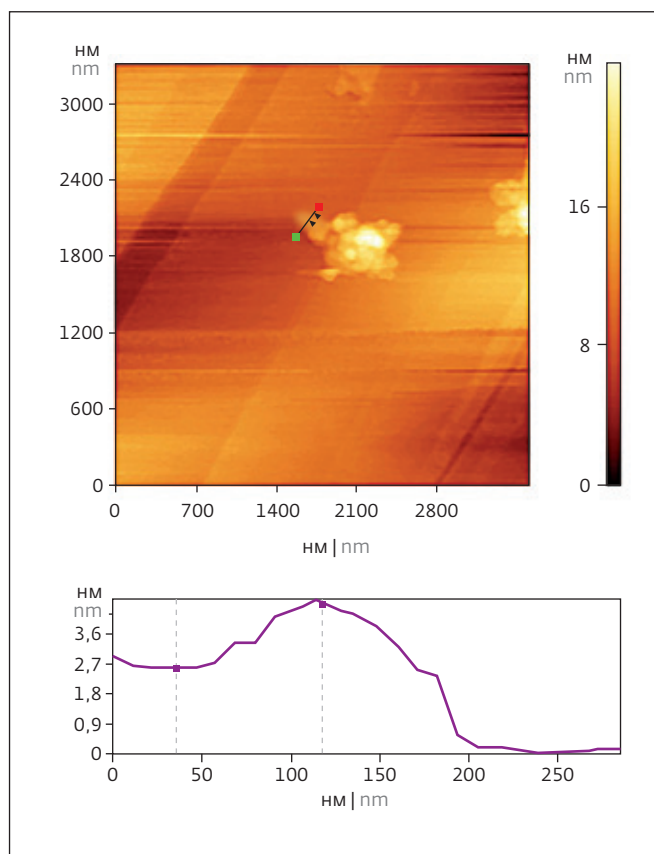


Рис.7. 2D-вид и сечение. Высота частицы глины с модифицированной поверхностью 1,9 нм  
Fig.7. 2D view and cross section. Height of the clay particle with modified surface 1.9 nm

В данной работе были получены 3D-изображения носителей на основе кальций-фосфатных, хитозановых, золотых наночастиц, а также наноэмульсий на основе неионогенных ПАВ. Оценены такие параметры, как характер адсорбции на гидрофобной поверхности графита, склонность к агрегации, характер распределения по поверхности, геометрические размеры частиц.

Сканирующая зондовая микроскопия может использоваться в качестве инструмента для трехмерной визуализации с точностью до единиц нанометров и для измерения локальных механических и физико-химических свойств наноплатформ при конструировании композитов с биологически активными молекулами (различными регуляторными РНК и пептидами).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа А.И.Ахметовой, И.Ю.Ильиной, Ю.Д.Александрова, В.Е.Тихомировой, Е.В.Поповой поддержана РФФ (проект № 23-74-30003).



## ИНФОРМАЦИЯ О РЕЦЕНЗИРОВАНИИ

Редакция благодарит анонимного рецензента (рецензентов) за их вклад в рецензирование этой работы, а также за размещение статей на сайте журнала и передачу их в электронном виде в НЭБ eLIBRARY.RU.

**Декларация о конфликте интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Yang Z., Li Y. Dissection of RNAi-Based Antiviral Immunity in Plants. *Curr. Opin. Virol.* 2018, 32, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.08.003>
2. Dubrovina A.S.; Kiselev K.V. Exogenous RNAs for Gene Regulation and Plant Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 2282. <https://doi.org/10.3390/ijms20092282>
3. Li P., Huang Y., Fu C., Jiang S.X., Peng W., Jia Y., Peng H., Zhang P., Manzie N., Mitter N., Xu Z.P. Eco-friendly biomolecule-nanomaterial hybrids as next-generation agrochemicals for topical delivery. *EcoMat*, 2021, 3, Article e12132. <https://doi.org/10.1002/eom2.12132>
4. Zhi H., Chen H. *et al.* Layered Double Hydroxide Nanosheets Improve the Adhesion of Fungicides to Leaves and the Antifungal Performance. *ACS Appl. Nano Mater.* 2022. Vol. 5. PP. 5316–5325.
5. Yong J., Zhang R., Bi S. *et al.* Sheet-like clay nanoparticles deliver RNA into developing pollen to efficiently silence a target gene. *Plant Physiol.* 2021. Vol. 2. PP. 886–899.
6. Popova E.V., Tikhomirova V.E., Beznos O.V., Chesnokova N.B., Grigoriev Y.V., Klyachko N.L., Kost O.A. Chitosan-covered calcium phosphate particles as a drug vehicle for delivery to the eye. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2022. Vol. 40. P. 102493. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102493>
7. Popova E.V., Tikhomirova V.E., Beznos O.V., Grigoriev Y.V., Chesnokova N.B., Kost O.A. Chitosan nanoparticles – a drug delivery system in the anterior part of the eye. *Bulletin of Moscow University. Series 2: Chemistry*, 2023, Vol. 64 (2), PP. 141–151. <https://doi.org/10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-141-151>
8. Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. FemtoScan Online software in virus research. *NANOINDUSTRY.* 2021. Vol. 14, no. 1 (103). PP. 62–67. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2021.14.1.62.67>
9. Yaminsky I.V., Akhmetova A.I. FemtoScan Online software platform for biomedical applications and materials science. *Medicine and High Technologies.* 2018. Vol. 2. PP. 10–13.
10. Popova E.V., Matveeva O.D., Beznos O.V., Tikhomirova V.E., Kudryashova Y., Grigoriev Y.V., Chesnokova N.B., Kost O.A. Chitosan-covered calcium phosphate particles co-loaded with superoxide dismutase 1 and ace inhibitor: Development, characterization and effect on intraocular pressure. *Pharmaceutics.* 2023. Vol. 15, no. 2. P. 550. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020550>
11. Neuhaus B., Frede A., Westendorf A.M., Epple M. Gene silencing of the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  with siRNA delivered by calcium phosphate nanoparticles, quantified by different methods. *J. Mater. Chem. B.* 2015. Vol. 3. PP. 4186–7193. <https://doi.org/10.1039/C5TB01377A>
12. Kolge H., Kadam K., Ghormade V. Chitosan nanocarriers mediated dsRNA delivery in gene silencing for *Helicoverpa armigera* biocontrol. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* 2023. Vol. 189. P. 1055292. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105292>
13. Chuan D., Jin T., Fan R., Zhou L., Guo G. Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications. *Adv Colloid Interface Sci.* 2019. Vol. 268. PP. 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.03.007>
14. Yan S., Ren B., Zeng B., Shen J. Improving RNAi efficiency for pest control in crop species. *Biotechniques.* 2020, 68 (5), 283–290. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0171>
15. Kashyap P.L., Xiang X., Heiden P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2015. Vol. 77. PP. 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039>
16. Peng L.H., Huang Y.F., Zhang C.Z. *et al.* Integration of antimicrobial peptides with gold nanoparticles as unique non-viral vectors for gene delivery to mesenchymal stem cells with antibacterial activity. *Biomaterials.* 2016, 103, 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.06.057>
17. Zhang H., Goh N.S., Wang J.W., Pinals R.L., González-Grandío E., Demirel G.S., Butrus S., Fakra S.C., Del Rio Flores A. *et al.* Nanoparticle cellular internalization is not required for RNA delivery to mature plant leaves. *Nanotechnol.* 2022. Vol. 17. PP. 197–205. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-01018-8>
18. Yoo S.D., Cho Y.H., Sheen J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 1565–1572. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>